

Clonación y secuenciación de NBS-LRR: secuencias análogas a genes de resistencia en albaricoquero

Soriano JM, Vilanova S, Romero C, Llácer G, Badenes ML

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial, 46113, Moncada, Valencia. jsoriano@ivia.es

INTRODUCCIÓN

Genes de resistencia en plantas (NBS-LRR resistance genes) procedentes de distintas especies: tabaco (Whitham et al. 1994), arábidopsis (Parker et al. 1997), lino (Lawrence et al. 1995) y tomate (Milligan et al. 1998) fueron clonados y se observó que conferían resistencia a un amplio rango de enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y nemátodos. Además, los dominios de estos genes están ampliamente conservados entre especies, por lo que fue posible, mediante PCR con cebadores degenerados, amplificar secuencias análogas en otras especies vegetales. Estas secuencias se demostró que correspondían a genes candidatos de resistencia o análogos de genes de resistencia (RGAs). Análisis genéticos demostraron que los RGAs están repetidos de forma abundante en el genoma, estas copias están organizadas en "clusters" y fuertemente ligadas a loci de resistencia conocidos.

Como parte del estudio de identificación y clonación de genes de resistencia al virus de la sharka o PPV, en este trabajo se han amplificado mediante oligos degenerados secuencias análogas a genes de resistencia de albaricoquero, dichos fragmentos se clonaron, se secuenciaron y se comprobó que correspondían a RGAs.

MATERIAL Y MÉTODOS

DNA genómico de las variedades de albaricoquero "Goldrich" y 'Lito', ambas resistentes a sharka, se extrajo por el método del CTAB (Doyle & Doyle. 1990). Para la obtención de RGAs, se amplificó DNA genómico por medio de PCR, utilizando 4 cebadores degenerados (Gentzbittel et al., 1998) y (Kanazin et al., 1996) en 3 combinaciones (Tabla 1). La amplificación se ha realizado en un volumen de reacción de 25 µl; cada reacción contenía 20 mM TrisHCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.1 mM dNTPs; 1 µM de cada cebador; 50 ng de DNA y 1 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Los productos se separaron en geles de agarosa al 0.8% teñidos con Bromuro de Etidio (0.8 µg/µl) y se purificaron usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Los productos se clonaron en el vector pGEM-T easy (Promega).

Para comprobar que el producto amplificado correspondía a un RGA se secuenciaron 3 fragmentos clonados procedentes de un genotipo resistente a sharka del cruce 'Lito' x 'Lito'. Las secuencias obtenidas, al compararlas con la base de datos, se ha observado que presentan una gran homología con secuencias de genes de resistencia en otras especies vegetales.

A continuación se tomaron 50 colonias transformadas con fragmentos amplificados de la variedad "Goldrich" y 50 de la variedad "Lito". Se realizó la

extracción de los plásmidos y se amplificaron los fragmentos contenidos en ellos por medio de PCR con cebadores universales de M13 en un volumen de reacción de 100µl, conteniendo 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2µM de cada cebador, 200µM dNTPs y 2U de Taq DNA polimerasa (invitrogen).

Se separaron 10µl del producto amplificado en gel de agarosa para verificar la longitud del fragmento clonado y 20µl se utilizaron para el análisis de restricción. Las enzimas utilizadas fueron: *Hae* III, *Hin* fl, *Cfo* I, *Rsa* I y *Sau* 3AI. A partir de los patrones de restricción se realizó un análisis tipo "cluster", utilizando el UPGMA como criterio de agregación y el programa NTSYS (Exeter Software, Setauket, NY) (Rohlf.1993).

RESULTADOS

A partir de los patrones de restricción obtenidos de los fragmentos clonados se calculó, tanto para las bandas procedentes de 'Goldrich' como para las procedentes de 'Lito', una matriz de similaridad, usando la distancia genética de Nei (Nei, 1972). El dendrograma generado por el análisis tipo "cluster" a partir de la matriz de similaridad indicó que había 6 y 8 familias de RGAs en 'Goldrich' y 'Lito' respectivamente.

Las secuencias obtenidas tienen una gran homología con RGAs de otras especies por lo que se deduce que los fragmentos clonados corresponden a secuencias de este tipo de genes.

Este estudio se continuará mediante la secuenciación de varios clones por agrupación obtenida, con el fin de conocer las distintas familias de genes de resistencia presentes en albaricoquero. Posteriormente se elegirán unos representantes por familia para su posterior inclusión en un mapa genómico de la especie previamente construido.

BIBLIOGRAFÍA

- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. bul.* 19:11-15.
- Gentzbittel, L.; Mouzeyar, S.; Badaoui, S.; Mestries, E.; Vear, F.; Touruieille De Labrouhe, D. and Nicolas, P. (1998). Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet* 96:519-525.
- Kanazin, V.; Frederick Marek, L. and Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* 7:1195-1206.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VA (1998) The root Knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of

the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist*. 106:283-292.

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Publications Setauket. New York.

Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-111

Tabla 1: cebadores degenerados utilizados.

Combinación	primers degenerados	
	forward	reverse
I	NBS1-F	NBS1-R
II	Ploop-1	HD-4
III	NBS1-F	HD-4